基于简化基因组测序揭示水角的濒危机制

吴欣仪[1]，王蒙[1]，郑希龙[2]，张锐[3]，何松[4]，严岳鸿[1*]

（1.深圳市兰科植物保护研究中心（全国兰科植物种质资源保护中心），深圳市濒危兰科植物保护与利用重点实验室，兰科植物保护与利用国家林业与草原局重点实验室，广东深圳 518114； 2.广东药科大学 中药资源学院，广州 510006；3.中国科学院上海辰山植物科学研究中心，上海 201602；4.海口市湿地保护管理中心，海口 570135）

摘要：物种的遗传多样性是物种适应性和生存能力的关键因素。生境片段化是造成生物多样性丧失的重要因素之一，其对植物种群的遗传多样性有着重要影响。水角（*Hydrocera triflora*）处于地区性绝灭状态，其遗传多样性状况和濒危机制尚未有报到。该文收集了 7 个种群的 34 个水角样本，利用简化基因组测序技术（RAD-seq）获得了单核苷酸变异位点（SNP）。通过种群遗传多样性和遗传结构的分析，并结合种群历史动态分析和不同气候情景下物种潜在分布区预测，探讨了水角的濒危机制。结果表明：（1）水角遗传多样性较低（*Ho*=0.1569、*He*=0.1654、*Pi*=0.186 5），遗传分化系数较高；AMOVA 分析表明，遗传变异主要发生种群内；（2）Mantel 检测表明环境距离与遗传距离、地理距离均具有显著的正相关关系，分别为 *P*=0.044 7 和 *P*=0.008 2；（3）水角的有效种群大小从全新世中期开始持续下降，琼北火山群的爆发和人来活动起着不可忽视的影响；（4）生态位模拟表明与当代气候相比，在未来气候变化下水角的潜在分布区总面积变动不大，但在高 CO_2 排放的情景下，大量的高适生区将会丧失并转化为低适生区，特别是位于马来群岛的适生区几乎完全消失。结果表明生境片段化导致了水角较低的遗传多样性和有效种群大小的持续下降。因此，自身更新能力低以及人为活动干扰、城市化等不利的环境条件是导致其濒危的主要原因。建议加强对水角的就地保护，进行人工授粉等方法提高其基因流以增加其种群的遗传多样性。另一方面，要着重保护湿地免遭破坏。

关键词：生境片段化，简化基因组测序，遗传多样性，遗传结构，物种分布模型，种群历史动态

The RAD-seq revealed the endangered mechanism of *Hydrocera triflora*

WU Xinyi[1], WANG Meng[1], ZHENG Xilong[2], ZHANG Rui[3], HE Song[4], YAN Yuehong[1*]

(1. *Orchid Conservation & Research Center of Shenzhen and the National Orchid Conservation Center of China, Shenzhen Key Laboratory for Orchid Conservation and Utilization, Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Orchid Conservation and Utilization*, Shenzhen, 518114, Guangdong, China; 2. *School of Traditional Chinese Medicine Resources, Guangdong Pharmaceutical University*, Guangzhou 510006, China; 3. *Shanghai Chenshan Plant Science Research Center, Chinese Academy of Sciences*, Shanghai 201602, China; 4. *Haikou Wetland Protection and Management Center*, Haikou 570135, China)

Abstract： The genetic diversity of species was a key factor in their adaptability and survival capabilities. Habitat fragmentation was recognized as one of the key factors leading to biodiversity

基金项目：海口市林业局项目（HNJC2019-0801）；中国科学院战略性先导科技专项(A 类)（XDA19050404）。

第一作者：吴欣仪（1991-），硕士，工程师，研究方向为种群遗传学，（E-mail）460774031@qq.com。

***通信作者：**严岳鸿，博士，研究员，研究方向为植物多样性与保护，（E-mail）yhyan@sibs.ac.cn。

loss, and it had significant impacts on the genetic diversity of plant populations. *Hydrocera triflora* was in a regional extinction state, and the status of its genetic diversity and endangered mechanisms had not been reported. In this study, 34 samples of *H. triflora* from 7 populations were used to obtain single nucleotide variation sites by restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq). We discussed the mechanisms of endangerment of *H. triflora* by analyzing population genetic diversity and structure. Additionally, we combined these findings with historical population dynamics analysis and predictions of potential species distribution in different climate scenarios. The results were as follows: (1) *H. triflora* had low genetic diversity (*Ho*=0.1569, *He*=0.1654, *Pi*=0.1865) and low genetic differentiation; AMOVA analysis showed that genetic variation mainly occurred within populations; (2) The Mantel test indicated that there was a significant positive correlation between environmental distance and genetic distance, as well as geographical distance, with respective p-values of 0.0447 and 0.0082; (3) The effective population size of *H. triflora* had been continuously declining since the mid-Holocene. The eruption of the Qiongbei volcanic group and human activities played a significant role; (4) Compared to the modern climate, the total potential distribution area of *H. triflora* changed little in the future. However, in scenarios of high CO_2 emissions, the highly suitable area decreased significantly, especially in the Malay Islands where the suitable habitat virtually disappeared. The results indicated that habitat fragmentation led to a continuous decline in the genetic diversity and effective population size of the *H. triflora*. Therefore, the low self-renewal capacity, as well as detrimental environmental conditions such as human disturbance and urbanization, were the primary factors contributing to its endangered status. On the one hand, it was recommended to strengthen the in-situ protection of the *H. triflora*, employing techniques such as artificial pollination to enhance gene flow among populations and thereby increase genetic diversity. On the other hand, we should focus on protecting wetlands from destruction.

Key words: habitat fragmentation, RAD-seq, genetic diversity, genetic structure, species distribution models, demographic historical dynamics

生境片段化，简化基因组测序，遗传多样性，遗传结构，物种分布模型，种群历史动态

保护基因组学（conservation genomics）广义上是指将基因组技术和方法应用于保护生物多样性和物种保护工作中的一门学科（Allendorf et al., 2010），主要聚焦于物种的濒危机制与保护策略研究。评估物种的遗传多样性水平及其在个体和群体中的分布格局是对该物种保护遗传研究的重要内容（Hamrick & Godt，1996）。分子遗传标记是评价种质资源遗传多样性的重要工具，推动着保护遗传学的发展。虽然遗传信息早已运用在濒危物种的研究中，但是全基因组范围的大量信息标记却是最近 20 年才开始使用（Supple & Shapiro, 2018），最初也只是应用在少数的模式植物中。

高通量测序技术（high throughput sequencing）的飞速发展催生了简化基因组测序技术。RAD-seq（restriction site Associated DNA）是一种常见的简化基因组技术，通过测序限制性酶切位点附近的短片段，具有覆盖度较高、测序成本低等优点。它不受参考基因组的限制，能获得大量的高质量（single-nucleotide polymorphisms, SNP）信息位点（Davey et al., 2011；Narum et al., 2013）。目前 RAD-seq 已广泛应用于群体研究与分子育种等领域，包括分子标记开发、群体遗传分析、遗传图谱构建和全基因组关联分析等。孙维悦等（2022）通过简化基因组测序对濒危植物荷叶铁线蕨（*Adiantum nelumboides*）的保护基因组学研究，揭示了

其濒危机制。Cai 等（2021）对具有重要经济价值的热带雨林树种滇南风吹楠（*Horsfieldia tetratepala*）进行 RAD-seq 测序，制定了更有效的保护策略。曹毓蓉等（2022）利用 RAD-seq 对极危物种波叶杜鹃（*Rhododendron hemsleyanum*）的遗传特征进行无参考基因组分析，证明对于无参考基因组的极小种群野生植物（plant species with extremely small populations, PSESP）也可用简化基因组测序手段获取 SNP 分子标记。因此，相信针对无参考基因组的濒危物种，简化基因组测序可以获得充足的遗传信息，为保护基因组学研究提供有效工具。此外，有效种群大小的估计对于保护和管理濒危物种、了解种群动态以及预测遗传演化的方向和速度非常重要。种群历史动态是保护基因组学的重要研究内容（Girod et al., 2011）。在种群的演化过程中，气候变化和地质事件作为重要的外部作用力对种群的动态变化起着关键作用。

除了物种的自身特征、气候历史等因素影响着遗传多样性以外，生境片段化也是造成生物多样性丧失的重要因素之一（Wilcove et al.,1998），会导致遗传多样性降低、近交自交衰退、基因流减少和种群规模减少等（Young et al., 1996；陈小勇，2000；Honnay & Jacquemyn, 2007）。还会造成物种栖息地减少，影响传粉者数量，降低传粉率和繁殖成功率，从而影响物种的多样性（Aguilar et al., 2006；González-Varo et al., 2009）。生境片段化是指原先连续的生境被分割成不同规模和形状的片段而形成的新的生境格局（Wilcove & Mclellan, 1986）。目前，大部分的研究表明生境片段化对遗传多样性产生的负效应多于正效应（武晶和刘志民，2014）。在以专性传粉的石竹（*Dianthus deltoides*）研究中，发现片段化生境的石竹其种子结实率低并可能产生自交种子而进一步降低其种群的遗传多样性（Jennersten, 1988）。濒危植物 *Bankia goodii* 受生境片段化影响，其路边的物种个体繁殖力降低（Lamont et al., 1993）。因此，当濒危物种遭受生境片段化影响时，应进一步加强研究，以更好地理解生境片段化如何影响植物遗传多样性，揭示其濒危机制并提出有效的保护策略。

水角（*Hydrocera triflora*）系凤仙花科（Balsaminaceae）水角属多年生水生草本植物，产中国海南、印度、斯里兰卡、泰国、越南、老挝、柬埔寨、马来西亚及印度尼西亚。喜生于湖边、沼泽湿地或水稻田中。对海南省水角资源现状的调查发现，随着农村旅游的开发建设，水体改造，湿地被大量的开发利用，水角生境受到不同程度的破坏，该种分布范围越来越狭窄，十分罕见（王景飞等，2017）。在 IUCN 评估报告中，水角处于地区性绝灭状态（RE）级别。有关水角的相关研究较少，2014 年中国科学院昆明植物研究所在海口地区重新发现了该种植物，这是 30 多年来该物种在国内再次被发现。水角和凤仙花的花发育揭示了凤仙花科最早期分化谱系的进化趋势，花序从简单的轴生花序逐渐转变成更复杂的腋生花序以及花被片的分化是一个逐渐的过程（Janssens et al., 2012）。水角作为凤仙花科的单种属，研究其遗传多样性不仅可以评估生境片段化对遗传多样性的影响，同时也为凤仙花科的进化和系统分类提供基础数据。

本研究以来自海口地区 7 个种群的 34 个水角个体为试验材料，通过 RAD-seq 简化基因组测序技术，进行群体遗传分析，以探明以下内容：（1）基因组水平下水角的遗传多样性和遗传结构；（2）水角有效种群大小的历史变化；（3）不同气候情景下水角的潜在分布区变化。从而为水角种质资源的保护利用、育种策略的实施提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

对分布在海口市的水角进行野外采集（图 1），共收集到 7 个种群合计 34 个样本。每个种群均有一份凭证标本，存放于深圳市兰科植物保护研究中心标本馆（CNOCC）。每个种群具体信息见表 1。

表 1 水角样品采集信息

Table 1 Sample details of *Hydrocera triflora*

居群 Population	采样地点 Location	经度 Longitude（E）	纬度 Latitude（N）	样本量 Individual Number
东兴村 DXC	海南省澄迈东兴村 Dongxing Village, Chengmai County, Hainan Province	110°10.7227″	19°47.8291″	5
昌旺溪 CWC	海南省海口遵谭镇 Zuntan Town, Haikou City, Hainan Province	110°17.0243″	19°47.2118″	5
卜茂村 BMC	海南省海口市新坡镇卜茂村 Bumao Village, Xinpo Town, Haikou City, Hainan Province	110°18.7138″	19°46.4791″	4
卜壁村 BBC	海南省海口市新坡镇卜壁村 Bubi Village,Xinpo Town, Haikou City, Hainan Province	110°20.7326″	19°46.8353″	5
卜史村 BSC	海南省海口市美仁坡镇卜史村 Bushi Village, Meirenpo Town, Haikou City, Hainan Province	110°23.4264″	19°49.6518″	5
文选村 1 WXC1	海南省海口市新坡镇文选村 Wenxuan Village, Xinpo Town, Haikou City, Hainan Province	110°20.0377″	19°44.7409″	5
文选村 2 WXC2	海南省海口市新坡镇文选村 Wenxuan Village, Xinpo Town, Haikou City, Hainan Province	110°19.7120″	19°45.4986″	5







A. 花；B. 果实；C. 生境。

A. Flowers; **B**. Fruit; **C**. Habitat.

图 1 水角的形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of *Hydrocera triflora* species.

1.2 DNA 提取和 RAD 文库构建

本研究利用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒（DP305）进行适当改良后对所有样品的基因组 DNA 进行提取。通过琼脂糖凝胶电泳和 Qubit 浓度检测后，送至上海元莘生物医药科技有限公司。采用 *Eco*R I 限制性内切酶进行酶切，然后构建长度范围在 300~500 bp 的双端测序文库。纯化后的文库在 Illumina Novoseq 6000 测序平台完成该物种简化基因组测序。

1.3 获取单核苷酸多态性（SNP）

在测序数据下机后，利用 FastQC 软件进行质控，包括去除接头、poly_A 和低质量的数据，最后得到高质量的数据（Clean data），用于后续的分析。本研究利用 Stacks v2.54 软件（Catchen et al., 2013）对水角的 RAD-seq 数据进行无参 *De Novo* 组装和变异检测。分别运行 Stacks 软件内的 process_radtags 对样本进行过滤，除去不含 RAD 标签的序列。使用 ustacks 对每个样本建立位点，设置控制错配数的参数 M 为 3，每个等位基因所需的最小片段数量 m 为 3；运行 cstacks 程序构建包含所有位点信息的 catalog 目录文件，设置位点间允许的错配数 n 为 3；运行 sstacks 程序把每个样本比对到创建的目录上；再运行 tsv2bam、gstacks 以及 population 程序，得到包含 75 209 个 SNPs 位点的 vcf 文件。为保证下游分析的可靠性，再使用 VCFtools v0.1.13 软件（Danecek et al., 2011）对 Stacks 软件中检测出的 SNPs 进行进一步的过滤。设置--max-missing 0.9，即最大缺失率为 90%；--maf 0.05，将最小等位基因频率设置为 0.05；--minDP 5，确保基因型最小深度为 5。过滤后剩下高质量的 38 667 个 SNPs 用于后续群体遗传结构的分析。

1.4 群体结构分析

基于 34 个水角样品的 SNPs 位点，运行 vcf2phylip 脚本构建个体间的遗传距离矩阵，再利用 IQ_TREE v1.6.9 软件（Nguyen et al., 2015）使用最大似然法（maximum likelihood, ML）进行系统树的构建。根据 1 000 次重复的快速自展（Ultrafast bootstrapping, UFBoot）（Minh et al., 2013）和 SH-aLRT（Guindon et al., 2010）测试进化枝，得到最终的系统发育树。使用 FigTree v1.4.3 软件（http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/）可视化和编辑生成的树文件。

先将之前获得的高质量的 SNP 数据集使用 VCFtools 软件转换成 ped 和 map 文件，再将上步所得文件进行过滤生成 bed 文件。最后用 Admixture（Alexander et al., 2009）基于每个个体的基因型推断个体祖先成分，模拟在亚群数 K 为 2 到 7 情况下的分群情况，根据不同 K 值模拟下的最小交叉验证（cross validation, CV）获得最佳分群数。

本研究使用 GCTA v1.26.0 软件（https://yanglab.westlake.edu.cn/software/gcta/）生成用于 PCA 分析的矩阵，再用 R 中的 ggplot2 软件包绘制主成分分析的结果图。

1.5 群体遗传多样性分析

通过 Stacks 软件中的 Populations 子程序计算物种水平的近交系数（inbreeding coefficient, F_{IS}），观测杂合度（observed heterozygosity, *Ho*），期望杂合度（expected heterozygosity, *He*）。同时基于所有（变异和非变异）位点计算核苷酸多态性（nucleotide diversity, *Pi*）等遗传参数。再用 R 语言的 GroupGenome v2.6.1 程序包（Pfeifer et al., 2014）计算种间遗传分化系数（genetic differentiation, F_{ST}），衡量群体间遗传分化水平。

1.6 Mantel 相关性检验和分子方差分析

为了评估 7 个水角种群的遗传距离、地理距离以及环境距离之间的相关性，利用 R 软件中的“raster”和“rgdal”提取每个种群点的气候信息，构建 19 个环境因子的环境距离矩阵，利用“geosphere”构建地理距离的矩阵，利用“ape”读取遗传距离矩阵，再利用“ade4”对两两矩阵进行 9 999 次的 Mantel 重复检验，最后用“ggplot”进行 Mantel 检验结果的绘图。此外，利用 Arlequin 3.5 软件（Excoffier & Lischer, 2010）进行分子方差分析（analysis of molecular variance, AMOVA）。AMOVA 基于进化距离（evolutionary distance）来度量并计算单倍型（含等位基因）或基因型间的方差（δ2），从而推断群体不同遗传组分之间的变异水平。

1.7 有效群体大小分析

基于 SMC 模拟种群历史动态的方法是高度依赖于完整基因组上的重组图谱，并不适用于无参考基因组的物种（Li & Durbin, 2011）。而基于 SFS 的方法不依赖于位点之间的连锁或连续性（Gutenkunst et al., 2009），且对近期的种群历史大小变化有较高的分辨率（Liu & Fu, 2015; Lapierre et al., 2017）。因此，将所获得的 SNP 数据使用基于 SFS 的 Stairway Plot v2（Liu & Fu, 2020）推测水角在 100 个千年前（thousand years ago, kya）到 1 kya 间的 Ne 变化。生成无缺失且无连锁不平衡（linkage disequilibrium, LD）的 SNP 数据集，将 VCF 文件用 python 脚本 easySFS（https://github.com/isaacovercast/easySFS）建立一维（one-dimensional, 1D）SFS。将 SFS 状态指定为 folded，以统计次等位基因的 SFS。选择使位点数尽量多的 projection 值输出 SFS 信息，将 SFS 信息输入 Stairway Plot v2 运行所需的 blueprint 文件中。突变率设置为 1.0×10^{-8}/位点/代，2 年为一代，200 次自展检验用于计算 Ne 中位数及 95%置信区间。结果在 R 中可视化。

1.8 潜在分布区预测

根据材料采集，分布点经纬度信息由 GPS 实地定位获得和通过中国数字植物标本馆（http://www.cvh.org.cn/）和全球生物多样性信息网络（https://www.gbif.org/）等相关数据库，获取标本采集地经纬度信息，共收集到东南亚水角坐标信息 200 余个。对所有数据按照 MaxEnt 模型（http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent）要求进行标准化处理，并且为了防止在进行最大熵模型分析时出现过拟合现象，将水角的分布数据进行筛选，在 50 km^2 内的分布点仅保留一个，共计得到 29 个具有经纬度信息的水角分布点并整理生成 CSV 文件。

从全球气候数据库 WorldClim2.1（http://www.worldclim.org）分别下载全新世中期（MID, mid-Holocene; ~6000years BP）、当代（1970—2000 年）和未来（2081—2100 年）的 19 个生物气候变量，数据空间分辨率为 2.5 min（5k 分辨率）。未来气候情景选择 2 种经典的二氧化碳浓度路径，分别为 RCP2.6 和 RCP8.5，代表未来全球平均温度较现在增长的最低值（1.0 ℃）与最高值（2.0 ℃）。

运行 MaxEnt 软件模拟水角在不同气候情景下的潜在分布格局，设置训练集为 75%，测试集为 25%进行模拟分析。将物种分布数据与气候环境数据一起导入 MaxEnt 中，选择刀切法（jackknife）模型迭代 500 次，计算各环境变量对物种分布格局的贡献率，绘制响应曲线并制作预测图。加载到 ArcGIS 10.2 中，提取东南亚区域，根据生境适宜度指数（habitat suitability index, HSI），划分为四个等级。其中 $HSI \leq 0.1$ 为非适生区；$0.1 < HSI \leq 0.3$ 为低适生区；$0.3 < HSI \leq 0.5$ 中适生区；$HSI > 0.5$ 为高适生区。采用 ROC 曲线来评价模型预测结果的精准度，环境变量的贡献率判断影响物种分布的主导环境因子。

2 结果与分析

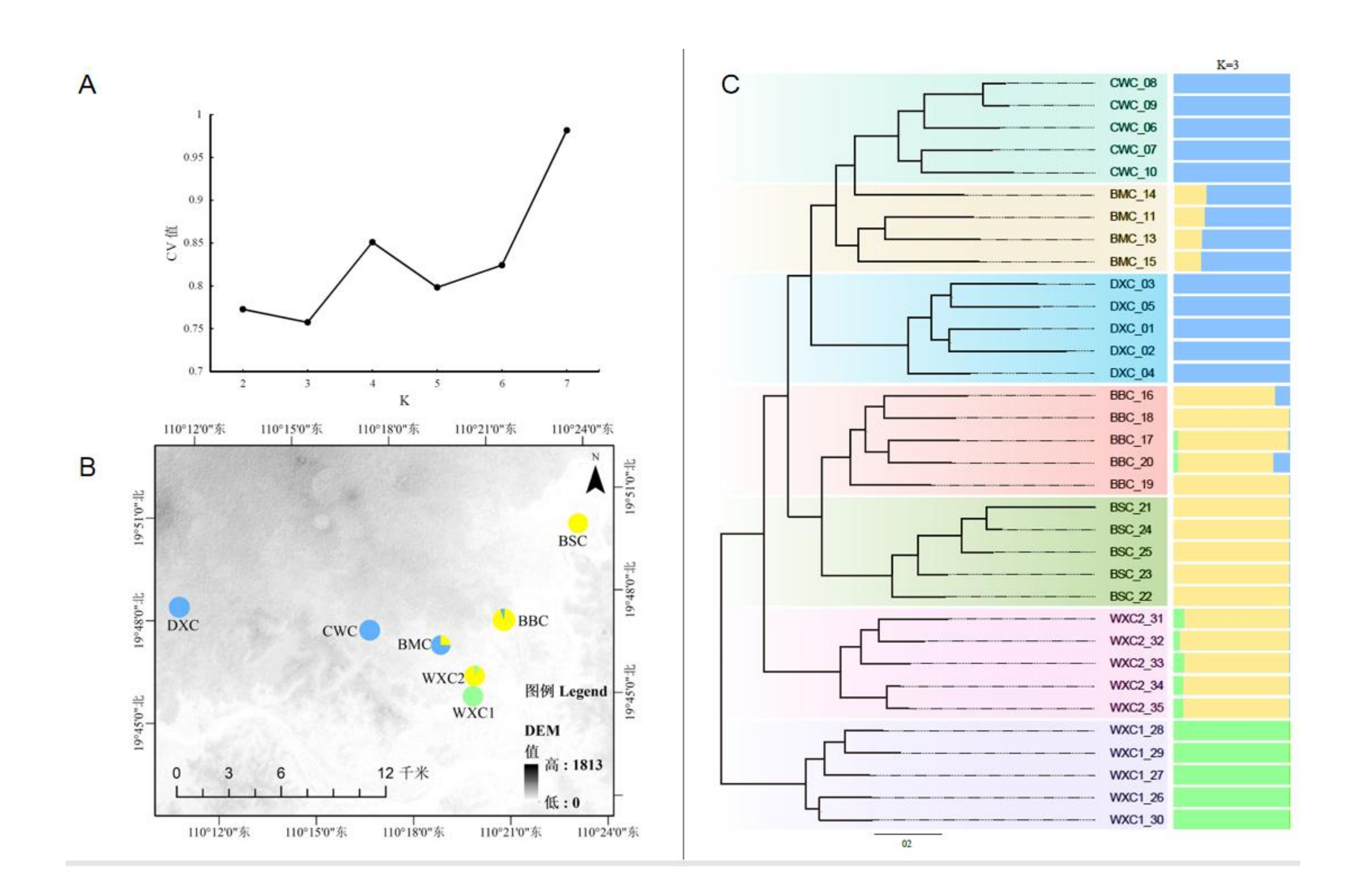
2.1 测序数据概况

本研究利用 RAD 简化基因组技术对 34 个水角样本进行测序，测序结果以 FASTQ（简称 fq）格式储存，包含了测序的序列信息和其对应的测序质量信息。经过质量评估和过滤后，共获得 37.91 Gb 的 clean data 数据，平均每个样本为 1.12 Gb。每个样本的 reads 读长在 2 512 919 到 55 093 740，其中 GC 含量均值为 36.2%，所有样本的 Q30 均值为 92.9%，表明测序质量较高，达到后续分析的要求。经过使用 Stacks 进行无参考基因组分析后，得到水角 34 个样本的平均位点数为 68 226，平均片段覆盖深度为 8.61X。经过 VCFtools 再次过滤后，最终获得 38 667 个高密度的 SNP 位点。

2.2 群体遗传结果分析

进行 Structure 分析发现，当 K=3 时，CV 值最小（图 2：A），说明 34 个个体可分为 3

个遗传聚类（图 2：B）。利用最大似然法（ML）基于 38 667 个 SNPs 位点对 34 个样本构建的系统进化树表明（图 2：C），每个种群的个体都能聚在同一个遗传分支上，并具有 100%的支持率。昌旺溪（CWC）、卜茂村（BMC）、东兴村（DXC）的遗传结构更相似为一组（Cluster1）；卜壁村（BBC）、卜史村（BSC）、文选村 2（WXC2）的遗传结构显示出更近的亲缘关系，倾向于另一组（Cluster2）；文选村 1（WXC1）表现出与其他种群不一样的遗传结构，为 Cluster3。主成分分析（PCA）是根据群体的原始数据矩阵计算出单个个体的特征向量，再绘制特征向量的散点图来获得群体分类情况。34 个样品基于主成分 1 和主成分 2 绘制 PCA 图（图 3）。可见，每个种群都分布得很集中，这与系统树结果一致。其中 DXC、CWC、BMC、BBC 和 WXC2 分布相对集中。在 PC2 维度上，WXC1 与其他种群相隔得较远，这与 structure 分析的结果一致。



A. 不同 K 值所对应的交叉验证错误值；B. 最佳聚类结果的地理分布，其中饼状图代表每个种群的遗传簇；C. 基于 38 667 个 SNP 的最大似然法建树结果和当 K=3 时的遗传结构分析结果。（当 K=3 时，每一个柱形代表 1 个样本，每种颜色代表 1 个遗传簇。）

A. The admixture validation error rate corresponding to the different K values; **B**.The distribution of best results in clusters by Structure. The pie chart represents the genetic cluster of each population; **C**. Maximum likelihood tree and structural analysis based on 38 667 SNPs and Results of the genetic structure analysisl with K =3. (When K=3, each color represents a genetic cluster.)

图 2 水角的群体遗传结构分析结果

Fig. 2 Analysis of population structure

颜色分别代表 7 个不同种群。

Colors represent 7 different populations.

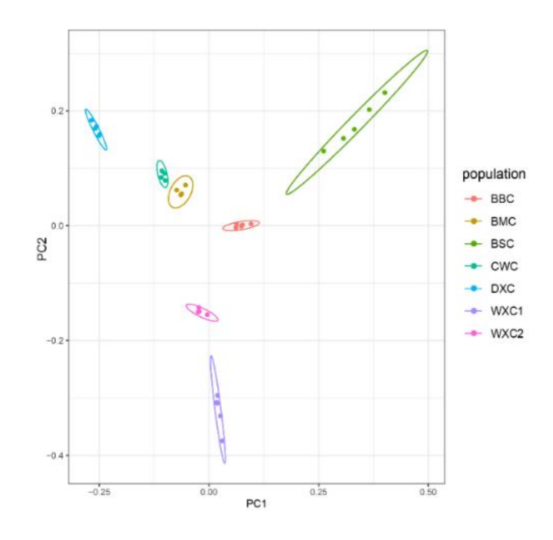


图 3 基于 SNPs 的水角 PCA 分析结果。

Fig. 3 Results of the principal component analysis of *Hydrocera triflora* based on SNPs

2.3 群体遗传多样性分析

对 7 个种群的遗传多样性信息进行的统计分析表明（表 2），34 份材料的平均观察杂合度（*Ho*）、期望杂合度（*He*）和核苷酸多样性（*Pi*）分别为 0.015 69、0.165 4 和 0.186 5，各种群中均具有特有等位基因，平均值为 828.29，其中 BSC 的特有等位基因最高（1 445），同时其观察杂合度最低（0.079 1）。核苷酸多样性（*Pi*）分析表明，核酸多样性 *Pi*=0.01502~0.2399，在采样地东部的 Cluster1 种群（BMC、CWC 和 DXC）具有更高的遗传多样性。近交系数 F_{IS} =-0.006 1~0.168 3，种群内近交系数（F_{IS}）平均值为 0.061 67，其中 CWC 和 WXC2 略为负值，说明该两个种群存在杂合子过剩现象。

基于 38 667 个 SNPs 位点的 34 个水角样本种群间成对的遗传分化系数 F_{ST} 值计算结果（表 3）表明：遗传分化系数 F_{ST} 为 0.203 5~0.584 6，其中 CWC 与 BMC 之间的 F_{ST} 值最小（0.203 5），表明两个种群间的遗传交流在所有种群间最为频繁。其他成对 F_{ST} 均大于 0.25 表明水角 7 个种群间的遗传分化程度较高。其中，文选村 1（WXC1）种群分化最大，与其他 6 个种群间的遗传分化系数均值为 0.528 1。

表 2 水角 7 个种群的遗传多样性

Table 2 Summary statistics of genetic diversity for seven populations

种群名称 Population	特有等位基因 Ap	观察杂合度 *Ho*	期望杂合度 *He*	核苷酸多样性 *Pi*	近交系数 F_{IS}
BMC	162	0.188 8	0.207 4	0.239 9	0.1
CWC	389	0.210 5	0.184 1	0.206 5	-0.004 8
DXC	1 385	0.179 8	0.177	0.199 3	0.041 3
BBC	408	0.126 8	0.160 9	0.180 5	0.115 5
BSC	1 445	0.079 1	0.143 8	0.161	0.168 3
WXC2	756	0.172 3	0.150 1	0.167 8	-0.006 1
WXC1	1 253	0.140 8	0.134 3	0.150 2	0.017 5

平均值 Average	828.29	0.156 9	0.165 4	0.186 5	0.061 67

表 3 种群间的遗传分化系数

Table 3 Pairwise F_{ST} values between each population

	CWC	BMC	BBC	BSC	WXC1	WXC2
DXC	0.445 4	0.353 8	0.445 0	0.498 4	0.550 9	0.549 6
CWC		0.203 5	0.404 9	0.497 4	0.539 6	0.520 6
BMC			0.288 7	0.394 4	0.450 0	0.414 2
BBC				0.392 1	0.498 7	0.501 2
BSC					0.544 9	0.548 7
WXC1						0.584 6

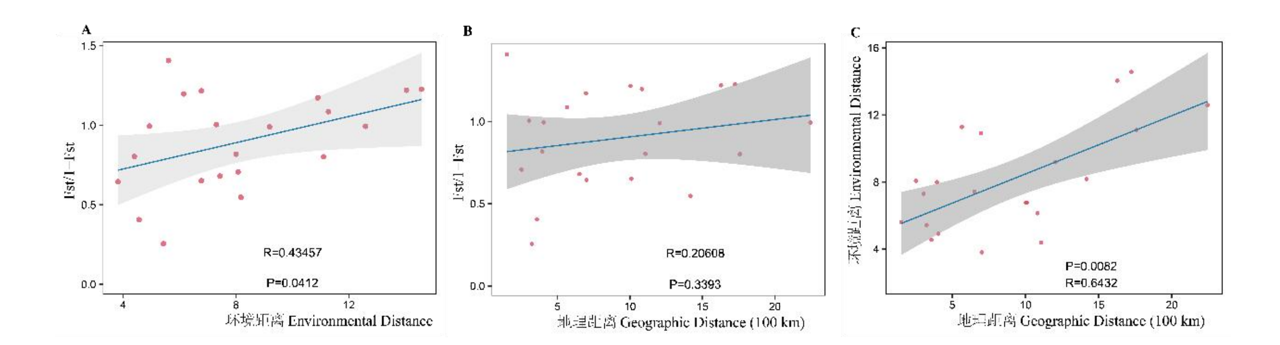
2.4 AMOVA 分子方差分析和 Mantel 检测

AMOVA 分子方差分析的结果（表 4）显示，当把 7 个水角种群分成上述 3 个群组时，9.35%的遗传变异发生在组间，群组间的遗传分化为 F_{CT}=0.093 53，说明群组间的遗传分化不显著。种群内的遗传变异占总变异的 52.65%，种群间的遗传变异率为 38%。基于遗传距离和环境距离的 Mantel 检测，结果表明两者之间存在显著正相关（R=0.434 57，P=0.044 7）（图 4：A）；基于遗传距离和地理距离的 Mantel 检测，结果证明两者之间不存在显著的联系（P=0.339 3）（图 4：B）；基于环境距离与地理距离的 Mantel 检测，结果表明，环境距离与地理距离存在显著的正相关关系，意味着两者之间存在很强的联系（R=0.643 2，P=0.008 2）（图 4：C）。

表 4 水角各组间分子方差分析

Table 4 AMOVA analysis among the groups of *Hydrocera trifloral*.

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	变异组分 Variance components	变异百分比 Percentage of variation
群组间 Among populations	2	37 703.709	283.67204 Va	9.35
组内种群间 Among populations within groups	4	50 840.824	1152.49490 Vb	38
种群内 Within populations	61	97 408.6	1596.86230 Vc	52.65
总计 Total	67	185 953.132	3033.02923	
F_{CT}			0.09353	



A. 成对遗传距离与环境距离；B. 成对遗传距离与地理距离；C. 环境距离与地理距离。

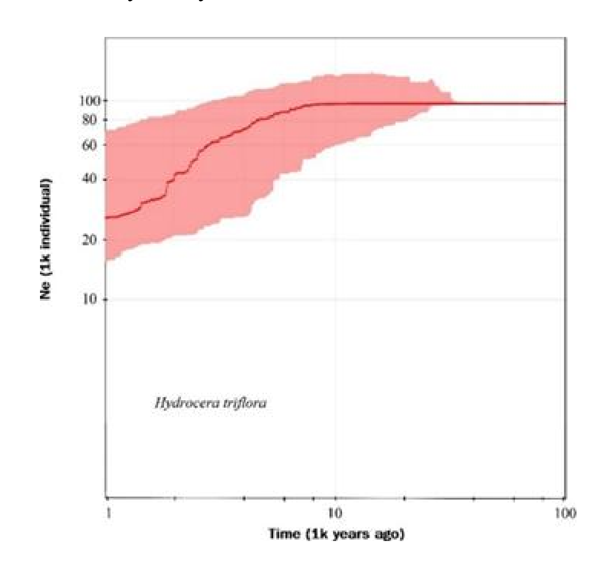
A. Pairwise genetic distance (F_{ST}/1-F_{ST}) is associated with environmental distance; B. Pairwise genetic distance is associated with geographical distance; C. Environmental distance is associated with geographical distance.

图 4 遗传距离、地理距离和环境距离之间的 Mantel 检测结果

Fig. 4 Mantel test results among genetic distance, geographi distance and environmental distance

2.5 群体大小历史分析

为在 Stairway Plot 中对水角的群体大小随时间变化进行推测，首先筛选到不连锁的 SNP 数量 38 667 个。Stairway Plot 推测该种群 100 kya 至 1 kya 的有效群体大小变化（图 5）。如图所示在 11.7 kya 的末次冰期（last glacial period, LGP）以后，种群有收缩趋势。在 MID 时期，特别是在 4 kya-2 kya，水角有效种群大小出现明显的下降。



粗线为中位数，阴影部分为 95%置信区间。

Thick lines represent the median, and shaded areas represent the 95% confidence intervals.

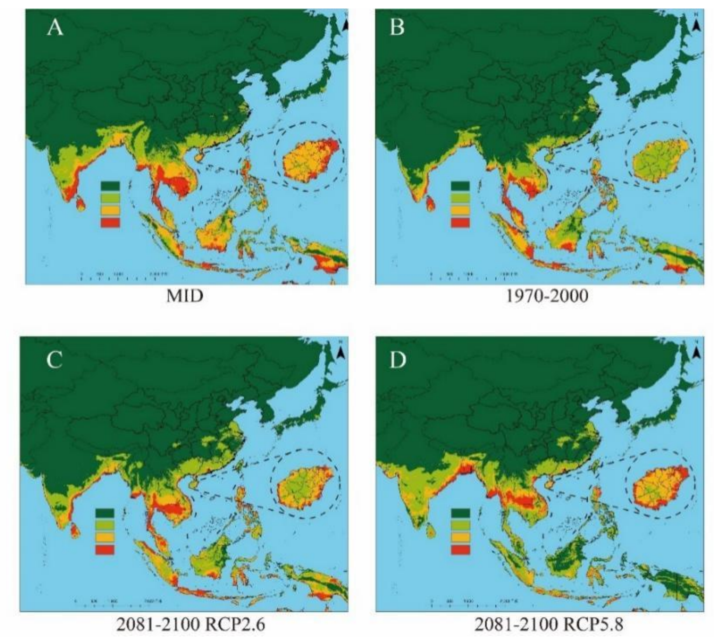
图 5 Stairway Plot 基于 SFS 的群体大小变化分析。

Fig.5 Changes in population size inferred by Stairway plot using folded site frequency spectrum (SFS).

2.6 不同情景下的潜在分布格局

根据 Maxent 模型 AUC 值均大于 0.952，表明该模型预测物种适宜分布区的结果比较可靠。在环境变量中，温度季节性、最冷月份的最低温度、年平均温度和海拔所占贡献率较大，表明它们是影响水角分布的主要环境因子。

结果表明从 MID 时期到当代（图 6：A、6：B 及表 5），水角的总适生面积大幅度的减少，主要表现在高适生面积减少 29%，中适生面积减少 34%。未来在二氧化碳浓度 RCP2.6 路径时期（图 6：C），水角的潜在分布总适生面积较当代增加了 4.74%，主要表现在低适生面积较当代增加了 33.40%。在二氧化碳浓度 RCP5.8 路径时期（图 6：D），水角的总适生面积变动不大，但是高适生面积大幅减少，高适生面积较当代减少了 23.32%，中适生面积较现在减少了 4.91%，而低适生面积增加了 72.85%。可以看出，在未来，随着二氧化碳浓度的升高，全球平均温度的升高，海平面的上升，生境破碎化严重，对水角的高适生区有很大的影响，大量的高适生区将会丧失或转化为低适生区。



A. 全新世中期情景；B. 当代（1970—2000）气候情景；C. 未来(2081—2100)RCP2.6 气候情景；D. 未来(2081—2100)RCP8.5 气候情景。（图中虚线圆圈部分为海南岛潜在分布区的放大图。深绿色：非适生区；浅绿色：低适生区；黄色：中适生区；红色：高适生区）

A. mid-Holocene climate scenarios; **B**.Contemporary (1970—2000) climate scenarios; **C**.Future (2081—2100) RCP2.6 climate scenarios; **D**. Future (2081—2100) RCP8.5 climate scenarios. (The dashed circle in the diagram represents an enlarged view of the potential distribution area of Hainan Island. Dark green: Unsuitable; Light green: Low suitable; Yellow: Medium suitable; Red: Highly suitable)

图 6 不同情景下水角的潜在分布格局。

Fig.6 Distribution of suitable habitats for *Hydrocera triflora* under different scenarios.

表 5 水角在不同时期不同环境变化下的适生面积

Table 5 The suitable area of *Hydrocera triflora* under different environmental changes in different periods

情景 Climate scenarios	总适生面积 Total suitable area	高适生 Highly suitable		中适生 Medium suitable		低适生 Low suitable		不适生 Unsuitable	
		面积 Area	比例 Proportion	面积 Area	比例 Proportion	面积 Area	比例 Proportion	面积 Area	比例 Proportion
全新世中期 MID	590.61	116.84	3.07	205.76	5.41	268.01	7.05	3 212.48	84.47
现代 Contemporary	416.75	82.95	2.18	135.65	3.57	218.91	5.76	3 365.80	88.50

未来 RCP2.6 Future RCP2.6	436.51	86.55	2.28	154.05	4.05	292.02	7.68	3 270.69	86.00
未来 RCP5.8 Future RCP5.8	403.76	63.59	1.67	128.99	3.39	378.58	9.95	3 399.55	89.38

3 讨论与结论

3.1 水角的遗传多样性：生境片段化降低了水角的遗传多样性

自 20 世纪 90 年代以来，生境片段化问题在国内逐渐受到关注，一直是保护生物学和生态学领域的研究热点之一。起初集中在热带雨林中开展（朱华等，2001；王喜龙等，2016），亚热带森林次之（李铭红等，2008）。在不同生境类型中，岛屿的研究仅占 2%（吴倩倩等，2017）。研究物种的遗传多样性，不但可以反映物种适应环境变化的潜力，而且还可以为物种资源特别是濒危物种现有的生存方式及状态进行有效的评估（Mable, 2019）。研究发现，由于遗传漂变和近交的原因，分布广泛的物种遗传多样性高于地理分布狭窄的稀有和濒危物种（Cole, 2003），遗传多样性水平较低是一个物种濒危或分布狭窄的普遍特征（Gitzendanner & Soltis, 2000；景昭阳等，2023）。核苷酸多样性是衡量群体遗传多样性的整体指标（Catchen et al., 2013）。本研究利用 SNP 分子标记对水角 7 个种群进行群体遗传学分析，结果显示水角具有较低的遗传多样性（*Pi*=0.186 5；*Ho*=0.156 9；*He*=0.165 4）。在濒危植物荷叶铁线蕨的群体遗传分析中也有类似的发现，其不同居群的平均核苷酸多样性 *P*i、观察杂合度 *H*o 和期望杂合度 *H*e 分别为 0.373、0.106 和 0.135（孙维悦等，2022）。与木本植物相比，草本植物具有更低的遗传多样性（Chung et al., 2020）。利用 RAD-seq 技术研究的极危树种波叶杜鹃的遗传多样性为（*Pi*=0.241 0；*He*=0.226 7）（曹毓蓉等，2022）。与同科的物种相比，水角的平均 *He* 为 0.165 4 略低于大旗瓣凤仙花(*Impatiens macrovexilla*)的 *He*(0.018 6)(Zhou et al., 2020）。同时本研究结果发现水角的平均观察杂合度小于平均期望杂合度，尽管结果在统计上不显著，但这也暗示着水角种群中存在杂合子缺失和一定程度的近交，是生境片段化的遗传效应的表现。Dixo 等（2009）研究发现，对巴西大西洋沿岸森林中蟾蜍种群遗传多样性与破碎化面积呈正相关，生境片段化对剩余栖息地之间的基因流也产生负面影响。生境片段化导致种群之间的遗传流动受到限制。这样的限制可能导致种群内部的近亲交配增加，杂合子缺失的发生，进而降低其遗传多样性。

对不同种群间的遗传距离的研究有助于对不同种群的遗传多样性进行研究，也可用来表述群体遗传结构差异。对于不同种群之间的群体遗传多样性可通过遗传分化系数（F_{ST}）来进行研究。当 F_{ST} 为 0.25 以上，表示种群间有很大的遗传分化（Wright, 1978）。在水角 7 个种群两两之间的 21 对 F_{ST} 中有 20 个 F_{ST} 大于 0.25，表明 7 个种群间的遗传分化水平较高。AMOVA 分析表明，水角 38%的遗传变异发生在组内群体间，而群体内的遗传变异更高，为 52.65%。当前并未见有对水角遗传多样性的研究，凤仙花科仅仅包括水角属和凤仙花属（*Impatiens*），这些植物在分类学上密切相关。因此，对凤仙花科的研究结果可以为水角的遗传多样性研究提供一些初步的参考和推测。钟云芳等（2014）利用 ISSR 对凤仙花科中的研究中，发现海南凤仙花自然种群的主要变异来自种群内（92%），种群间变异较少（8%），水角也有与之一致的结果，即种群内的遗传变异较大。同时在对大旗瓣凤仙花的研究中也发现，无论是利用 ISSR 分析（李祥军，2013）还是使用基于“跳跃基因”或基于逆转录转座子的引物间结合位点（Inter-Primer Binding Site, iPBS）标记系统来评估（Zhou et al., 2020），其种群内的遗传多样性大于种群间的，即主要的遗传多样性存在于种群内，表明该种在收集种质的每个地点都有广泛的基因型。在聚类分析、遗传结构分析和 PCA 分析中，我们发现

本研究收集到的海南水角群体可分为 3 个具有不同遗传组分的组。尽管存在这些不同的遗传组分，但其组间的遗传分化较低（F_{CT}=0.09353）。考虑到水角的生境特征以及人类建筑、农田等人为屏障的存在，我们推测亚居群的形成可能是由于生境隔离所致。

对水角的环境距离、遗传距离和地理距离的 Mantel 相关性检验结果表明：水角环境距离与地理距离具有显著的正相关（P=0.0082），同时环境距离和地理距离也存在显著的正相关（P=0.044 7），意味着水角种群之间的遗传分化与它们之间的环境差异有关，并且这种环境差异与地理距离的变化密切相关。但其地理距离与遗传距离没有显著相关性（P=0.339 3），即水角种群的遗传距离没有随着隔离距离的增加而增加。这与海南凤仙花自然种群的遗传距离和地理距离呈显著的高度相关性（r=0.952，P<0.01）有差异（钟云芳等，2014）。这可能是水角不同于广泛的水生植物，其具有肉质假浆果，裸露于水面或沉入水中，可供鸟类或鱼类等动物取食，因此其地理距离不能反应其种群的遗传距离。也可能与水角的狭窄分布，不同种群间其地理距离过近有关。总的来说，水角种群遗传分化水平高，遗传距离与环境距离相关但与地理距离不相关，这说明水角种群间的遗传分化主要受到生境片段化所引起的环境距离的影响，而不是地理距离的影响。

3.2 水角的群体历史:万年前琼北火山群爆发后水角种群大小急剧衰退

物种的种群历史动态是其所经历的历史事件和遗传特性共同作用的结果（Hewitt, 2000），能预测物种当前和未来的生存力（Hare et al., 2011）。本研究通过使用大量的 SNP 标记对水角进行群体大小历史分析，发现水角在 100 kya 到末次冰期之前，有效种群大小都相对稳定，我们推测这与全新世早期，全球性气候转温，海南岛植物区系较为兴盛发达有关（颜家安，2006）。水角的有效种群大小从末次冰期（LGP：11.2 kya）后开始持续下降，直至现在（图 5）。琼北火山群的喷发活动可能发生在距今约 1 万年左右（樊棋诚等，2004），这与水角有效种群大小开始下降时间吻合，推测琼北火山群的喷发活动可能引起土地破坏、气候变化或其他环境因素的改变，导致水角生境的片段化，限制了水角的基因交流。在 MID 时期，水角有效种群大小在明显下降。全新世中期，是一个全球范围内人类活动扩张的重要时期。在这个时期，人类社会经历了从狩猎采集生活方式向农业和定居生活的转变，这对环境演化也产生了重要影响。在新石器中晚期，有 1 万余人觅食于海南岛，与植物争地，植物生境也逐渐发生较大的变化（司徒尚纪，1987）。蒋有绪等（2002）对海南岛北部火山口沉积孢粉的研究，发现海南岛的农业活动早在 3000aBP 就开始对地低植物具有较明显的影响。由此推测水角的有效种群大小在历史时期首先受到琼北火山群爆发的影响，进而又受到人类活动的影响，两种因素叠加导致生境的持续变化。这种有效种群大小的减少可能导致了其遗传多样性的丧失和种群的遗传分化，逐渐形成如今的分布格局。

3.3 水角的潜在分布格局：高 CO_2 排放情境下水角的高适生区转变为低适生区

在环境因子贡献率的分析中，本研究分析所得，温度季节性、最冷月份的最低温度和年平均温度的总贡献率占比达 67.6%，这与水角喜温怕寒，温度低于 15 ℃即停止生长的生活习性相符（王景飞等，2017）。而海拔占了第四高的贡献率 7.4%，表明它是影响水角分布的主要环境因子之一，也佐证了在海南凤仙花的研究中低海拔的遗传多样性远远高于高海拔梯度的种群这一结果，说明海拔是影响群体基因流的重要因素（钟云芳等，2014）。

对不同气候情景下东南亚地区的水角的潜在分布适生区进行模拟分析，结果表明从 MID 时期到当代，水角的总适生面积大幅度的减少（表 5），其中位于海南岛的适生区由高适生区和中适生区的分布格局转变为当代的以低适生区为主的分布格局（图 6：A、6：B）。这与种群历史大小的分析结果一致，表明从 MID 时期开始，水角的生存受到威胁直至现在。与当代气候相比，在未来气候变化下水角的潜在分布区总面积变动不大，但低适生面积较当代增加了 33.40%。特别是在二氧化碳浓度 RCP8.5 路径的气候环境情景下，高适生面积较现在减少了 23.32%，取而代之的是低适生面积增加了 72.85%。其中，位于马来群岛的适生区

几乎完全消失（图 6：D）。根据 IPCC（intergovernmental panel on climate change, IPCC）发表的《第六次评估报告》，在 SSP5-8.5（shared socioeconomic pathway, SSP）的气候环境下，二氧化碳排放量到 2050 年将增加一倍，到 2100 年全球平均气温将高 4.4 摄氏度。我们推测这可能与气候变暖条件下亚热带北界向北推移有很大的关联，未来 CO_2 浓度升高将引起全球变暖，动植物的分布逐渐向高纬度和高海拔地区移动（Tingley, 2014），从而导致水角在马来群岛的适生区近乎消失。这些分析结果表明，未来的气候变化将进一步影响水角的适生区，特别是高适生区将面临丧失和转变的风险。这说明水角种群面临着适生环境变化的挑战。

人类开荒、伐木、放牧等活动，以及交通和水库建设等是造成全球的自然生境和生物多样性都面临着生境丧失和片段化威胁的主要原因（Laurance et al., 2014; Haddad et al., 2015）。城市化也加剧着栖息地的破碎化，特别是对于城市中残余的小种群本土植物更是如此。

对于水角而言，较低的遗传多样性水平，可能削弱了其在迁徙过程中的适应潜力，导致其有效种群规模降低。种群内的遗传分化水平较高，说明其自然种群之间的基因流动较少。环境距离与遗传距离、地理距离之间都存在显著的正相关关系，表明环境因素在水角种群遗传分化中起到重要的作用，而地理距离则作为间接因素通过影响环境差异来影响遗传分化的发生。因此限制水角种群发展的重要原因来自于其自身较低的遗传多样性和生境因素，具体表现为湿地生境的片段化严重，再加上人为活动干扰、城市化等不利的环境条件使得其生境进一步被破坏，种群规模进一步减小，逐步形成如今地区性绝灭状态。针对水角濒临灭绝这一现象，一方面要着重保护湿地免受人为因素的破坏，其次进行就地保护，更有效的提高其群体的遗传特性。另一方面进行人工授粉等方法提高其基因流，以促进其种群的发展。

参考文献：

AGUILAR R, ASHWORTH L, GALETTO L, et al., 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis [J]. Ecol Lett, 9(8): 968-980.

ALEXANDER DH, NOVEMBRE J, LANGE K, 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals[J]. Genome Res, 19(9): 1655-1664.

ALLENDORF FW, LUNDQUIST LL, 2003. Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species[J]. Conserv Biol, 24-30.

CAI C, XIAO J, CI X, et al., 2021. Genetic diversity of *Horsfieldia tetratepala* (Myristicaceae), an endangered plant species with extremely small populations to China: implications for its conservation[J]. Plant Syst Evol, 307(4).

CAO YR, MA YP, ZHANG XJ, et al.,2022. Genetic characteristics of Rhododendron hemsleyanum based on SNP molecular markers[J]. Journal of Yunnan University(Nat Sci Ed), 44:1-11. [曹毓蓉，马永鹏，张秀姣，等，2002．基于 SNP 分子标记的波叶杜鹃遗传特征分析[J]. 云南大学学报（自然科学版），44：1-11.]

CATCHEN J, BASSHAM S, WILSON T, et al. 2013. The population structure and recent colonization history of Oregon threespine stickleback determined using restriction-site associated DNA-sequencing[J]. Mol Ecol, 22(11): 2864-2883.

CATCHEN J, HOHENLOHE PA, BASSHAM S, et al, 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics[J]. Mol Ecol, 22(11):3124-3140.

CHEN XY, 2000. Effects of habitat fragmentation on genetic structure of plant populations and implications for the biodiversity conservation[J]. Acta Ecol Sin, 20(5): 884-892. [陈小勇，2000. 生境片断化对植物种群遗传结构的影响及植物遗传多样性保护[J]. 生态学报，20（5）：884-892.]

CHUNG MY, SON SW, Herrando-Moraira S, et al., 2020. Incorporating differences between

genetic diversity of trees and herbaceous plants in conservation strategies[J]. Conserv Biol, 34(5): 1 142-1 151.
COLE CT. 2003. Genetic variation in rare and common plants[J]. Annu Rev Ecol Evol Syst, 34(1): 213-237.
DANECEK P, AUTON A, ABECASIS G, et al., 2011. The variant call format and VCFtools**[J]**. Bioinform, 27(15):2156-21568.
DAVEY JW, HOHENLOHE PA, ETTER PD, et al., 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing[J]. Nat Rev Genet, 12: 499-510.
DIXO M, METZGER JP, MORGANTE JS, et al., 2009. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest[J]. Biol Conserv, 142(8): 1560-1569.
EXCOFFIER L, LISCHER HE, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. Mol Ecol Resour, 10(3): 564-567.
FAN QC, SUN Q, LI N, et al., 2004. Periods of volcanic activity and magma evolution of Holocene in North Hainan Island[J]. Acta Petr Sin, 20(3): 533-544. [樊祺诚，孙谦，李霓，等，2004. 琼北火山活动分期与全新世岩浆演化[J]. 岩石学报，20(3)： 533-544.]
GIROD C, VITALIS R, LEBLOIS R, et al., 2011. Inferring population decline and expansion from microsatellite data: a simulation-based evaluation of the Msvar method[J]. Genetics, 188(1): 165-179.
GITZENDANNER MA, SOLTIS PS, 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners[J]. Amer J Bot, 87: 783-792.
GONZÁLEZ-VARO JP, ARROYO J, APARICIO A, 2009. Effects of fragmentation on pollinator assemblage, pollen limitation and seed production of Mediterranean myrtle (Myrtus communis) [J]. Biol Conserv, 142(5): 1058-1065.
GUINDON S, DUFAYARD JF, LEFORT V, et al., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0[J]. Syst Biol, 59(3): 307-321.
GUTENKUNST RN, HERNANDEZ RD, WILLIAMSON SH, et al., 2009. Inferring the joint demographic history of multiple populations from multidimensional SNP frequency data[J]. PLoS genetics, 5(10): e1000695.
HADDAD NM, BRUDVIG LA, CLOBERT J, et al., 2015. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth’s ecosystems[J]. Sci Adv, 1(2): e1500052.
HAMRICK JL, GODT MJW, 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plants[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 351(1345): 1291-1298.
HARE MP, NUNNEY L, SCHWARTZ MK, et al., 2011. Understanding and estimating effective population size for practical application in marine species management[J]. Conserv Biol, 25: 438-449.
HEWITT G, 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages[J]. Nature, 405: 907-913.
HOLSINGER KE, WEIR BS, 2009. Genetics in geographically structured populations: Defining, estimating and interpreting[J]. Nat Rev Genet, 10(9): 639-650.
HONNAY O, JACQUEMYN H, 2007. Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation[J]. Conserv Biol, 21(3): 823-831.
JANSSENS SB, SMETS EF, ALEXANDER V, 2012. Floral development of *Hydrocera* and

Impatiens reveals evolutionary trends in the most early diverged lineages of the Balsaminaceae[J]. Ann Bot, (7): 1285-1296.

JENNERSTEN O, 1988. Pollination in Dianthus deltoides (Caryophyllaceae): effect of habitat fragmentation on visitation and seed set[J]. Conserv Biol, 2: 359-366.

JIANG YX, WANG BS, ZANG RG, et al., 2002. Tropical Rainforest Biodiversity and Its Formation Mechanism in Hainan Island[M]. Beijing: Science Press: 30-84. [蒋有绪，王伯荪，藏润国，等，2002. 海南岛热带雨林生物多样性及其形成机制[M]. 北京：科学出版社：30-84.]

JING ZY, CHENG KG, SHU H, et al., 2023. Whole genome resequencing approach for conservation biology of endangered plants[J]. Biodivers Sci, (31): 22679. [景昭阳，程可光，舒恒，等，2023. 全基因组重测序方法在濒危植物保护中的应用[J]. 生物多样性，(31)：22679.]

LAMONT BB, KLINKHAMER PGL, WITKOWSKI ETF, 1993. Population fragmentation may reduce fertility to zero in Banksia goodie-a demonstration of the Allee effect[J]. Oecologia, 94: 446-450.

LAM-TUNG N, SCHMIDT HA, ARNDT VH, et al., 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies[J]. Mol Biol Evol, (1): 268-274.

LAPIERRE M, LAMBERT A, ACHAZ G, 2017. Accuracy of demographic inferences from the site frequency spectrum: the case of the Yoruba population. Genetics, 206: 439-449.

LAURANCE WF, CLEMENTS GR, SLOAN S, et al., 2014. A global strategy for road building[J]. Nature, 513: 229-232.

LI H, DURBIN R, 2011. Inference of human population history from individual whole-genome sequences[J]. Nature, 475(7357): 493-496.

LI MH, SONG RS, JIANG YF, et al., 2008. Plant diversity in the six evergreen broad-leaved forest fragments in East China[J]. Acta Ecol Sin, 28(3): 1137-1146. [李铭红，宋瑞生，姜云飞，等，2008. 片断化常绿阔叶林的植物多样性[J]. 生态学报，28(3)：1137-1146.]

LI XJ, TANG WX, HUANG SX, et al., 2013. ISSR analysis for genetic diversity of *Impatiens macrovexilla* in Guilin[J]. Guangdong Agric Sci, 40(13): 142-144. [李祥军，唐文秀，黄仕训，等，2013. 桂林大旗瓣凤仙花遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 广东农业科学，40(13)：142-144.]

LIU XM, FU YX, (2015). Exploring population size changes using SNP frequency spectra[J]. Nature Genetics, 2015, 47(5): 555-559.

LIU XM, FU YX, (2020) Stairway Plot 2: demographic history inference with folded SNP frequency spectra[J]. Genome Biol, 21: 280.

MABLE BK, 2019. Conservation of adaptive potential and functional diversity: integrating old and new approaches[J]. Conserv Genet, 20(1): 89-100.

MINH BQ, NGUYEN M, HAESELER AV, 2013. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap[J]. MoL Biol Evol, 30(5): 1188-1195.

MORRELL PL, BUCKLER ES, ROSS-IBARRA J, 2012. Crop genomics: advances and applications[J]. Nat Rev Genet, 13: 85-96.

NARUM SR, BUERKLE CA, DAVEY JW, et al., 2013. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics[J]. Mol Ecol, 22: 2841-2847.

PFEIFER B, WITTELSBÜRGER U, RAMOS-ONSINS S E, et al., 2014. PopGenome: an efficient Swiss army knife for population genomic analyses in R[J]. Mol Biol Evol, 31(7):

1929-1936.

SITU SJ, 1987. Historical land development research in Hainan Island [M]. Haikou: Hainan People's Publishing House, 9-19. [司徒尚纪，1987. 海南岛历史上土地开发研究[M]. 海口：海南人民出版社，9-19.]

SUPPLE MA, SHAPIRO B, 2018. Conservation of biodiversity in the genomics era[J]. Genome Biol, 19: 131.

SUN WY, SHU JP, GU YF, et al., 2022. Conservation genomics analysis revealed the endangered mechanism of *Adiantum nelumboides*[J]. Biodivers Sci, 30(7): 21508. [孙维悦，舒江平，顾钰峰，等，2022. 基于保护基因组学揭示荷叶铁线蕨的濒危机制[J]. 生物多样性，30(7)：21508.]

TINGLEY R, VALLINOTO M, SEQUEIRA F, et al., 2014. Realized niche shift during a global biological invasion[J]. PNAS, 111: 10233-10238.

WANG JF, LV DR, HUANG S, et al., 2017. The resource status and investigation analysis of endangered aquatic plants in Hainan Province [J]. Chin Hort Abstr, 33(12): 4.[王景飞，吕德任，黄赛，等，2017. 海南省濒危水生植物水角的资源现状及调查分析[J]. 中国园艺文摘，33(12)：4.]

WANG XL, LIU Q, YU DL, et al., 2016. Diversity of epiphytic orchids in fragmental limestone forests in Xishuangbanna, China[J]. Guihaia, 36(2):162-169. [王喜龙，刘强，余东莉，等，2016. 西双版纳片段化石灰岩森林附生兰科植物多样性研究[J]. 广西植物，36(2)：162-169.]

WILCOVE DS, MCLELLAN CH, 1986. Habitat fragmentation in the temperate zone[J]. Conserv Biol, 6:237-256.

WILCOVE DS, ROTHSTEIN D, DUBOW J, et al.1998. Quantifying threats to imperiled species in the United States[J]. BioScience, 48(8): 607-615.

WRIGHT S, 1978. Evolution and the Genetics of Populations, Volume. 4: Variability within and among Natural Population[M]. Chicago: University of Chicago Press.

WU J, LIU ZM, 2014. Effect of habitat fragmentation on biodiversity: a review[J]. Chin J Ecol, 33(7): 1946-1952. [武晶，刘志民，2014. 生境破碎化对生物多样性的影响研究综述[J]. 生态学杂志，33(7)：1946-1952.]

WU QQ, LIANG ZS, LIU JJ, et al., 2017. Effects of habitat fragmentation on biodiversity in China[J]. Chin J Ecol, 36(9): 2605-2614. [吴倩倩，梁宗锁，刘佳佳，等，2017. 中国生境片段化对生物多样性影响研究进展[J]. 生态学杂志，36(9)：2605-2614.]

YOUNG A, BOYLE T, BROWN T, 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants[J]. Trend ecol evolut, 11(10): 413-418.

ZHONG YF, HU XY, SONG XQ, et al., 2014. ISSR analysis on population genetic diversity of *Impatiens hainanensis* (Balsaminaceae), an endemic species to Hainan island[J]. Chin J Trop Crops, 35(6): 1041-1046. [钟云芳，胡翔宇，宋希强，等，2014. 基于 ISSR 分子标记的海南凤仙花种群遗传多样性[J]. 热带作物学报，35(6)：1041-1046.]

ZHOU J, GUAN S, SONG Q, et al., 2020. Retrotransposon-based genetic variation and population structure of *Impatiens macrovexilla* Y. L. Chen in natural habitats and the implications for breeding[J]. Sci Hortic, 276: 109753.

ZHU H, XU ZF, WANG H, et al., 2001. Over 30-year changes of floristic composition and population structure from an Isolated fragment of tropical rain forest in Xishuangbanna[J]. Acta Bot Yunnan, 23(4): 415-427. [朱华，许再富，王洪，等，2001. 西双版纳片断热带雨林 30 多年来植物种类组成及种群结构的变化[J]. 云南植物研究，23(4)：415-427.]